

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 61-146192

(43)Date of publication of application : 03.07.1986

(51)Int.Cl.

C12P 19/00
C12P 19/04
//(C12P 19/00
C12R 1:645)
(C12P 19/04
C12R 1:645)

(21)Application number : 59-266963

(71)Applicant : SHINOHARA SATOSHI

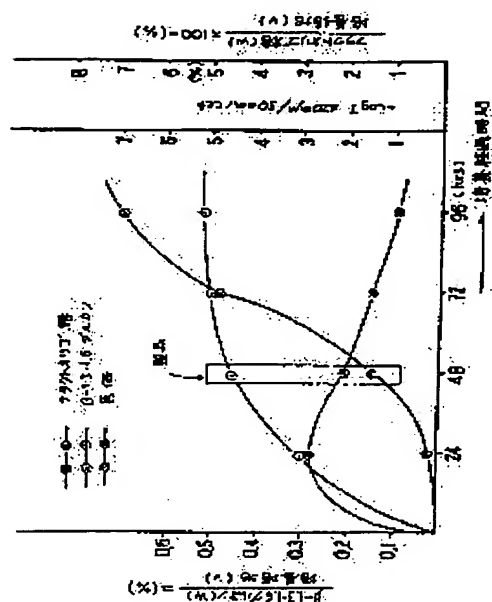
(22)Date of filing : 17.12.1984

(72)Inventor : SHINOHARA SATOSHI

(54) PRODUCTION OF CULTURE LIQUID**(57)Abstract:**

PURPOSE: To obtain a cultured liquid containing fructo-oligosaccharide and β -1,3-1,6-glucan and useful as a health drink and intestine-conditioning agent, etc., by culturing a specific microorganism in a liquid medium containing sucrose.

CONSTITUTION: A microbial strain belonging to Aureobacidium genus is cultured in a liquid medium containing $\leq 10.00\text{wt}\%$ sucrose, $0.01\text{W}0.30\text{wt}\%$ rice bran, $0.10\text{W}0.20\text{wt}\%$ vitamin C and $0.01\text{W}0.10\text{wt}\%$ vitamin E, under aeration and agitation. Fructo-oligosaccharide and β -1,3-1,6-glucan having physiological activity are produced in the culture medium in the course of culture, and the cultured liquid is used as a health drink optionally after purification.

**LEGAL STATUS**

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's]

decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭61-146192

⑬ Int. Cl. ⁴	識別記号	庁内整理番号	⑭ 公開 昭和61年(1986)7月3日
C 12 P 19/00		7110-4B	
19/04		7110-4B	
//(C 12 P 19/00			
C 12 R 1:645)		6760-4B	
(C 12 P 19/04			
C 12 R 1:645)		6760-4B	審査請求 未請求 発明の数 1 (全8頁)

⑮ 発明の名称 培養液の製造方法

⑯ 特 願 昭59-266963

⑰ 出 願 昭59(1984)12月17日

⑱ 発 明 者	篠 原 智	日向市高砂町82
⑲ 出 願 人	篠 原 智	日向市高砂町82
⑳ 代 理 人	弁理士 梶原 克彦	

明 細 書

1. 発明の名称

培養液の製造方法

2. 特許請求の範囲

(1) オウレオバンディウム属(Aureobacidium, sp)を、蔗糖10.00重量%以下 米糠0.01~0.30重量% ビタミンC 0.10~0.20重量% ビタミンE 0.01~0.10重量%からなる液体培地で通気攪拌培養するフラクトオリゴ糖と β -1,3-1,6グルカン

を主成分とする培養液の製造方法。

(2) 通気攪拌培養時間は72時間以下である特許請求の範囲第1項記載の培養液の製造方法。

3. 発明の詳細な説明

(発明の対象 産業上の利用分野)

本発明は、オウレオバンディウム属(Aureobacidium, sp) FERM-P.No 4257, ATCC.No 20524, IF 0. No 7757菌を、蔗糖を使用して液体培養し、フ

ラクトオリゴ糖と β -1,3-1,6グルカンを含む培養液の製造に関するものであり、その培養液は加熱殺菌後、そのまま又は、物理的に固型物を除去して健康維持飲料(腸内ビフィズス菌の増殖、便秘防止、免疫増強)整腸剤、家畜の整腸剤等に利用出来る。

(従来技術)

本発明は、オウレオバンディウム属(Aureobacidium, sp) FERM-P.No 4257, ATCC.No 20524 (以下本国と称する)による β -1,3-1,6グルカンの生産研究に於て、蔗糖を炭素源として液体培養すると、培地中の蔗糖が培養初期から三糖、四糖になる事を液体クロマトで検出した事に始まる。

此の糖を分離し、物理的、化学的分析(メチル化、GC-MS、NMR 分析)の結果、蔗糖のフラクトースにフラクトースが β -1,2結合(イヌリン型結合)で1~2ヶ結合したオリゴ糖、更に詳しくは1ヶストース(1-Kestose)、ニーストース(nystose)である事が明確になった。

特開昭61-146192 (2)

更には、本菌は底糖を炭素源とした培地で液体培養すると、主として菌体内又は菌対外に果糖転移酵素であるフラクトシルトランスフェラーゼ (Fructosyl-Transferease) を産生する事を見出した。

本菌が、果糖転移酵素を菌体内に含有し、底糖をフラクトオリゴ糖 (Fructo-oligo) に変える事は、新規多糖である β -1,3-1,6グルカンの生産研究に於て全く予期しないことであった。然も底糖濃度が0.5%と非常に低い濃度で底糖をフラクトオリゴ糖に変えていることは驚くべき事である。

又、本菌は底糖をまずフラクトオリゴ糖に変え、このフラクトオリゴ糖を除々に分解して利用する事を見出した。即ち底糖は本菌により培養初期にフラクトオリゴ糖になり、培養経過時間とともに7糖〜8糖になるが98〜120時間で分解されてフラクトースとグルコースになり、この単糖が本菌に利用されて、菌体外に β -1,3-1,6グルカンを生産する。 β -1,3-1,6グルカンは底糖濃度が高

ルカンを主成分とする培養液の製造方法である。即ち、菌の培養過程で生理活性を有する2成分であるフラクトオリゴ糖と β -1,3-1,6グルカンを同時に培養培地中に産生させ、その培養液を直接又は精製して、健康維持飲料 (腸内ビフィズス菌の増殖、便秘防止、免疫増強) 整腸剤、に利用出来るようにしたものである。

フラクトオリゴ糖は、人間のビフィズス因子として特に優れている事が証明されている。 β -1,3-1,6グルカンについては、具体的には担子菌等から得られた β -1,3-1,6グルカン、特に非還元性末端が β -1,6結合で分岐したグルカンが、免疫増強において優れている事が証明されている。

本発明は、微生物を培養してフラクトオリゴ糖と β -1,3-1,6グルカンを含有する培養液の製造方法であり、見方を換えれば培液中にフラクトオリゴ糖と β -1,3-1,6グルカン (リンゴ酸とリン酸を結合した新規多糖) を同時に生成せる方法である。

此の二成分を含有する培養液は人の健康に有用な

くなるにつれてその生産量が減少し、培地中の底糖濃度が30%になるとブルランのみを生産する。

本発明者は上述の知見により、フラクトオリゴ糖と β -1,3-1,6グルカンの両成分を同時に含有する培養液を本菌で製造する方法を確立した。

尚本菌による新規多糖、即ち β -1,3-1,6グルカンの産生、構造に関しては本発明者が日本特許出願番号58-035001号 (特開昭57-149301号) に詳細に記述している。又本菌によって底糖からフラクトオリゴ糖を製造する方法及び果糖転移酵素に関しては、日本国特許出願番号58-134881号及び、58-148583号に詳細に記述している。

(発明の構成)

本発明は、オウレオバシディウム属 (*Aureobacidium*, sp) を、底糖10.00重量%以下 米糠0.01〜0.30重量% ビタミンC 0.10〜0.20重量% ビタミンE 0.01〜0.10重量% からなる液体培地で通気攪拌培養するフラクトオリゴ糖と β -1,3-1,6グ

飲料になる事は、フラクトオリゴ糖がビフィズス因子である事、 β -1,3-1,6グルカンが免疫増強作用を有する事からも推測する事が出来る。

オーレオバシディウム属 (*Aureobacidium*, sp) は、通常黒酵母といわれ、ブルラン (グルコースが α -1,4結合した、マルト・トリオースが α -1,6結合した高分子多糖) 生産菌として良く知られており、本発明で用いられるオーレオバシディウム属は、微工研菌第4257菌 (FERM-P.No 4257菌)、ATCC.No 20524菌として既に登録されている。

本発明者は本菌を使用して、新規多糖である β -1,3-1,6グルカンのみを産生する製法を確立し、その詳細は日本国特許出願番号58-035001号 (特開昭57-149301号) 及び米国特許出願番号、No353888に明記されている。

具体的には、炭素源として底糖を使用し、米糠、ビタミンC、ビタミンEを含有する液体培地組成で、此の培地を通気攪拌培養して培地中に β -1,3-1,6グルカンのみを産生させる。この培養液は多

特開昭61-146192 (3)

菌特有の粘稠な液体である。

培養地組成は、底糖0.50~1.00% (W/V)、米糠0.20% (W/V)、ビタミンC (アスコルビン酸) 0.20% (W/V) 又はビタミンE (トコフェロール) 0.01~0.10% (W/V) が最適濃度である。第1図に β -1,3-1,6グルカン産生条件での液体培養経過とその代謝を示す。培養液中に産生される β -1,3-1,6グルカンは、培養時間48時間までに急上昇するが、その後はゆるやかになる。ビタミンC無添加の場合は、 β -1,3-1,6グルカンの産生量は、添加の場合に比較して1/5以下となる。

培養液の色は、24時間を過ぎると急上昇するが48時間を過ぎると黄褐色となる。ビタミンC無添加の場合は培養液は黒褐色となる。即ち細胞表面に黒色色素が蓄積されてくる。

β -1,3-1,6グルカンの産生濃度は最終的に0.50%~0.60%の低濃度であるが、その溶液の粘度は非常に高く、粘着性が全くなく、卵白の様にぬめらかである。

β -1,3-1,6グルカンの水溶液粘度(相対粘度)C.

定する培養時間48時間に於ける培養地中の糖組成を、液体クロマトで分析した結果を表1に示す。

表1

糖組成	溶液中%(W/V)	%/solid
β -1,3-1,6グルカン	0.45	
グルコース (G)	0.102	2555
フラクトース (F)	0.141	3529
イヌロビオース (F)	0.016	396
シュクロース (GF)	0.014	352
1-kestose (GF ₂)	0.035	881
ニイストース (GF ₃)		2290
1- β フラクト・		
フラノシル・kestose	0.092	
GF ₅ 以上		

又液体クロマト分析を第3図に示す。この液体培養液中のフラクトオリゴ糖濃度は、0.12%で非常に低濃度である。

本発明者は、培養液中の β -1,3-1,6グルカン濃

P / 20° C を第2図に示す。

培養地に炭素源として使用した底糖は、本菌が産生するフラクトシルトランスフェラーゼで培養初期からフラクトオリゴ糖 (1-Kestose, mystose) とグルコース (Glucose) になるが、培養経過とともにグルコースとフラクトース (Fructose) が増加してくる。この事は底糖からのフラクトオリゴ糖産生が、培養経過とともに最大となるが、次第に減少していく事を明示している。

β -1,3-1,6グルカンの産生培養で培養地の底糖が、低濃度に於て培養初期からフラクトオリゴ糖、即ち1-kestoseとグルコースになる事を見出すことにより、本発明者は本菌を使用して、底糖からフラクトオリゴ糖を製造する事を確立する事が出来た。詳細は日本国特許出願 No58-134861 に明記してある。

本発明における β -1,3-1,6グルカンの培養条件である底糖1.00重量%、ビタミンC (アスコルビン酸) 0.20重量%、米糠0.20重量%で液体培養し、 β -1,3-1,6グルカンの培養液産生量が一応安

度を最大に保って、尚、フラクトオリゴ糖濃度を高くする方法を見出した。

即ち、培養地中の底糖濃度を増加させても、 β -1,3-1,6グルカンの産生量が変わない底糖濃度を見出した。この底糖濃度は5.00重量%~10.00重量%である。

β -1,3-1,6グルカンの産生培養地である底糖、米糠、ビタミンC (アスコルビン酸)、ビタミンEのうち、底糖濃度のみを変動させる。

具体的には底糖濃度を増加して液体培養をする。培養経過とともにいずれの場合も、底糖はフラクトオリゴ糖とグルコースに変わる。然し、 β -1,3-1,6グルカンの産生量は0.50重量%~5.00重量%が最大で、底糖濃度が増加するにつれてプルランが産生されてくる。底糖濃度が30重量%になると β -1,3-1,6グルカンは全く産生されず、プルランのみが産生される。

本発明者は、本菌が β -1,3-1,6グルカンを液体培養で産生する培養地組成を見出し、その製造法を確立した。この事は日本国特許出願 No 58-0

35001、米国特許出願 No353,968 に明記してある。

本発明では、培地中の底糖濃度がオーレオバシディウム属による β -1,3-1,6グルカンの産生を抑制する事を知見し、この知見に基づいて、 β -1,3-1,6グルカンとフラクトオリゴ糖を主成分とする培養液の製造方法を確立するに至った。

表2に β -1,3-1,6グルカンの産生培地、即ち、米糠0.20重量%、ビタミンC（アスコルビン酸）0.20重量%、底糖1.00重量%の底糖濃度のみを増加させた培地組成で（5.00% 10.00% 20.00% 30.00%）98時間液体培養した培養液中の β -1,3-1,6グルカン、プルラン、フラクトオリゴ糖含有量を示す。

表2

培養培地中 (W/V)%				
底糖濃度 (%)	β -1,3-1,6 グルカン	プルラン	フラクトオリゴ糖	CP/20°C
0.5	0.32	—	0.036	200

エタノール濃度で不溶になる物質を分離し、減圧乾燥したものを重量測定し、この重量物を（B）とする。そして（A）-（B）=プルランとして表示し、（B）を β -1,3-1,6グルカンとして表示した。

β -1,3-1,6グルカンに関しては赤外分析で β 結合を確認し、更に β -1,3-1,6グルカナーゼでゲンチオビオース、グルコースを確認した。

β -1,3-1,6グルカンとプルランを除去した固形物中のフラクトオリゴ糖は、液体クロマトで分析し（島津製作所の101型HL.P.C）、重量（%）で表示した。

培地中の底糖濃度が30.00%以上になるとプルランのみを培地中に産生し、 β -1,3-1,6グルカンは全く産生されない。然し、培地中の底糖は培養経過時間とともにフラクトオリゴ糖になり、底糖濃度が30.00%の時、98時間でフラクトオリゴ糖の産生量は最大となるが、目的とする β -1,3-1,6グルカンを含む粘質な培養液は産生出来ない。培地中の底糖濃度を5.00%~10.00%とすること

特開昭61-146192 (4)

5.0	0.58	—	1.64	900
10.0	0.50	0.08	4.75	900
20.00	0.17	0.30	10.35	10.0
30.00	—	0.45	17.43	4.0

98時間培養

（試験例）

培養は、100mlの三角フラスコに β -1,3-1,6グルカン産生培地を各々50mlずつ入れ、各々底糖濃度を0.50% 5.00% 10.00% 20.00% 30.00%に調整後、pH5.2 温度25°Cで98時間振盪培養し、その培養液を10000r.p.mで10分間遠心処理し、上澄液について試験した。

粘度はオストワルド粘度計で相対粘度として表われ、 β -1,3-1,6グルカンは、上澄液に等量のエチルアルコールを加えアルコール濃度を50%（V/V）にし、不溶物質を遠心除去後、減圧乾燥し、重量を測定した。この重量物を（A）とする。この（A）を再度蒸留水（100ml）に溶解し、プルラン分解酵素（林原生物化学研究所）であるプルランナーゼ（pullulanase）を作用させ、更に50%

により目的とする β -1,3-1,6グルカンとフラクトオリゴ糖を含有する粘質な培養液を産生することが出来る。フラクトオリゴ糖の産生量を最大にする培養時間は30~48時間である。

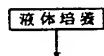
表3に β -1,3-1,6グルカン産生培地に於て培地中の底糖濃度が5%の液体培養経過時間に於ける培地中の β -1,3-1,6グルカンと、フラクトオリゴ糖の産生量を示す。

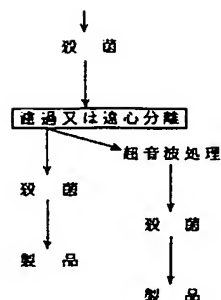
表3

培養経過時間	β -1,3-1,6グルカン	フラクトオリゴ糖
	培養培地中 (W/V)%	培養培地中 (W/V)%
24	0.30	2.50
48	0.45	2.00
72	0.54	1.64
98	0.58	1.40

表4に β -1,3-1,6グルカン培養液の製造方法のフローチャートを示す。

表4





本菌を底糖濃度5.00～10.00 %で液体培養し（培養時間48～72時間）、110℃で10分間殺菌後、培地中の菌体又は固形物を除去する為に濾過又は遠心分離をし、再度殺菌して製品とするか、又は粘性を低下させる為に超音波処理し、殺菌後製品とする。

以下余白。

培養培地中の色価は48時間以上になると急激に上昇し、培養培地は黄褐色になる。この物質はエタノール可溶で単純脂質が主成分をなしている。

培養培地中のフラクトオリゴ糖は、24時間でピークとなりその後は減少する。β-1,3-1,6グルカンでは48時間でその生産量が安定する。この時点で培養を中止してβ-1,3-1,6グルカンとフラクトオリゴ糖を含有する培養液を得た。

第5図に48時間培養に於ける、培地中のフラクトオリゴ糖組成の液体クロマト分析を示す。得られた培養液は、110℃で10分間殺菌後、10.000r.p.mで10分間遠心分離処理して米糠、菌体を除去し、再度殺菌して製品とする。

β-1,3-1,6グルカンを除去した培養培地中の糖組成を表5に示す。

表5

培養経過時間	% グルコース	% フラクトース	G-F フルクトース	G-F ₂ トランスフルクトース	G-F ₃ トリスフルクトース	G-F ₄ テトラフルクトース	その他	F-F フルクトース
0	—	—	100	—	—	—	—	—
24	26.93	4.26	10.9	34.1	21.9	—	—	1.86

特開昭61-146192 (5)

(実施例)

本発明を実施例に基づき更に詳細に説明する。

実施例(1)

100mlの三角フラスコに、底糖1.00%、米糠0.20%、ビタミンC 0.20% pH5.2の培地組成の培養培地を50ml入れ、温度25℃で48時間振盪培養した培養液を種菌として使用した。本培養は5lのジャーファーマンターを使用し、3lの水導水に、底糖（グラニュー糖）150g、米糠6g、ビタミンC（アスコルビン酸）6gを入れ、溶解後、NaOH（カセイソーダ）でpHを5.2に調整した。その後、115℃で15分間殺菌し、冷却後、温度25℃で三角フラスコに培養した培養液を50ml添加した。

培養条件は、通気攪拌で、通気量は仕込量の1/2（v/v）（1.5l/分間）、攪拌は100r.p.mで温度は25℃±2である。

第4図に培養経過時間に於ける代謝産物（β-1,3-1,6グルカン、フラクトオリゴ糖、その他）を示す。

48	29.4	16.4	7.8	19.9	18.0	5.4	—	2.9
72	25.5	35.0	4.5	11.0	10.0	8.0	G-F ₂ 1.0	4.0
98	22.6	50.0	3.0	4.0	15.0	6.5	G-F ₂ G-F ₃ 2.0 1.5	4.5

この表からわかることは、培養初期には1-ケストースが主成分であるが、菌体の有するフラクトシルトランスフェラーゼで培養経過時間とともにニイストース、1,6フラクトフラノシル、ケストースが増加し98時間になるとフラクトース、グルコースが主成分となりフラクトオリゴ糖（G-F_n）（n=3～6）は少量となる。日本国特許出願No58-134681 58-148583に記述してある様に、反応時間とともにフラクトオリゴ糖の高分子化が進み、培養液中のフラクトオリゴ糖含有量は低下し、グルコース、フラクトース含有量が増加する。

48時間培養に於ける最終製品のβ-1,3-1,6グルカンとフラクトオリゴ糖を含有する培養液分析品質を表6に明示する。

表6

分析項目	(w/v) %
β-1,3-1,6グルカン	0.45

特開昭61-146192 (6)

フラクトオリゴ糖	2.20
糖組成	
グルコース (G)	29.4
フラクトース (F)	16.4
1-kestose (G-F ₂)	19.9
ニイストース (G-F ₃)	18.0
1-フラクトフラノシル-kestose (G-F ₄)	5.4
イヌロピオース (F ₂)	2.9
シュクロース (G-F)	7.8
粘度 (CP/20°C) (相対粘度)	*① 50 cp
pH	5.2
色価 (吸光度) / -log T, 420mμ	1.5

本実施例によって製造された製品は、そのまま飲食するとまろやかな甘味を有し、その物性は卵白状で、他の飲料、具体的には天然ジュース、乳酸飲料、コーヒー等に5%前後入れて飲食すると、飲料が大変にまろやかな味を呈する。

又本製品の粘性等から判断して、各種の食品の増粘剤或いは改質剤にも使用出来る。

実施例 (II)

培養条件にかかわらず本菌の場合は、底糖に依存している事が明らかである。

本実施例による培養液は、表6に明示した如くβ-1,3-1,6グルカンが培養培地中には全く産生されず、少量のブルランのみが産生される為に粘性が全くない培養液になる。

また、経過時間による培養培地中のフラクトオリゴ糖含有量にはほとんど差がないが、フラクトオリゴ糖組成に於て相違しているのが特徴である。

表8に48時間、72時間培養時の培養培地中のフラクトオリゴ糖組成の比較を明示する。

表8

培養培地中の糖組成	培養時間	48時間	72時間
グルコース	(W/V%)	25.0	28.04
フラクトース		2.56	2.35
イヌロピオース		1.28	1.37
1-kestose		40.06	29.21
ニイストース		16.5	30.0
1-フラクトフラノシル-kestose		—	—

培養培地組成は、水湯水3Lに底糖（グラニュー糖）900g、米糠6g、ビタミンC（アスコルビン酸）6gを添加し、pHを5.2に調整し殺菌後、通気攪拌培養する。この培養培地に実施例1で得られた種菌を接種した。

培養条件は実施例1の条件と同様である。

培養経過時間毎の培養培地中の代謝産物を表6に明示する。

表7 (W/V%) 培養培地

培養経過時間	β-1,3-1,6グルカン	ブルラン	フラクトオリゴ糖	粘度 CP/20°C
0	0	0	0	—
24	0	0.10	12.0	2.1
48	0	0.35	16.8	3.0
72	0	0.45	18.0	3.8
96	0	0.50	15.0	4.0

このようにβ-1,3-1,6グルカン産生条件で底糖濃度のみを30%に増加すると、培地中に全くβ-1,3-1,6グルカンを産生せずブルランのみを産生する。然し、底糖はフラクトオリゴ糖に変換する。この事はフラクトシルトランスフェラーゼは

シュクロース | 15.7 | 9.02

(発明の効果)

このように本発明によって製造されたβ-1,3-1,6グルカンとフラクトオリゴ糖を含有する培養液は、加熱殺菌後そのまま、又は物理的に固型物を除去して健康維持飲料（腸内ビフィズス菌の増殖、便秘防止、免疫増強）整腸剤、寝食の整腸剤等に利用出来る。

この培養液をそのまま飲食するとまろやかな甘味を有し、天然ジュース、乳酸飲料、コーヒー等に5%前後入れて飲食すると、飲料が大変にまろやかな味を呈する。

又、本培養液のうち粘性を有するものは、各種の食品の増粘剤或いは改質剤にも使用出来る。

更に、本培養液中のフラクトオリゴ糖はビフィズス菌増殖因子、ノンカロリー糖、その他低血糖性等を有し、β-1,3-1,6グルカンは免疫増強作用等の生理活動を有するので、本培養液を主成分と

特開昭61-146192 (7)

する飲料は、人間の健康に対してすぐれた効果を
 与える。

4. 図面の簡単な説明

第1図は β -1,3-1,6グルカン産生条件での液体
 培養経過とその代謝を示す図。

第2図は、 β -1,3-1,6グルカン水溶液の相対温
 度 (cp/20℃) を示す図。

第3図は β -1,3-1,6グルカン産生条件 (蔗糖濃
 度1.0%) 培養経過時間48時間後に於ける培養
 培地中の糖組成を島津製作所LC-4A型液体クロマ
 トで分析したチャートを明示した図である。

第4図は β -1,3-1,6グルカンとフラクトオリゴ
 糖を含有する培養液製造条件に於けるフラクトオ
 リゴ糖と β -1,3-1,6グルカンの生成量又は培養培
 地中の色価を示した図である。

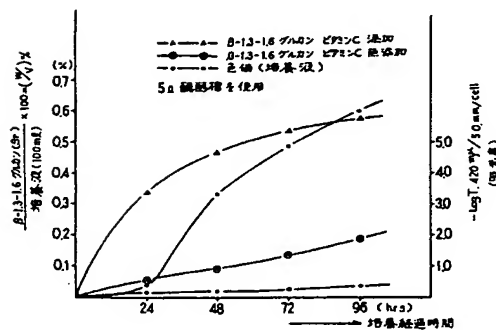
第5図は β -1,3-1,6グルカンとフラクトオリゴ糖
 を含有する培養液 (培養時間48時間) 中のフラクト
 オリゴ糖組成を液体クロマトで (島津製作所、LC
 -4A型分析カラム、101N型を使用) 分析した

チャートを明示した図である。

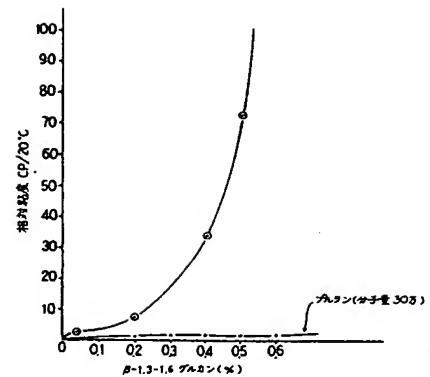
特許出願人 磯原 智

代理人 弁理士 梶原 克彦

第1図

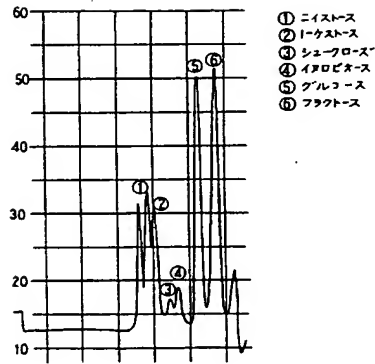


第2図

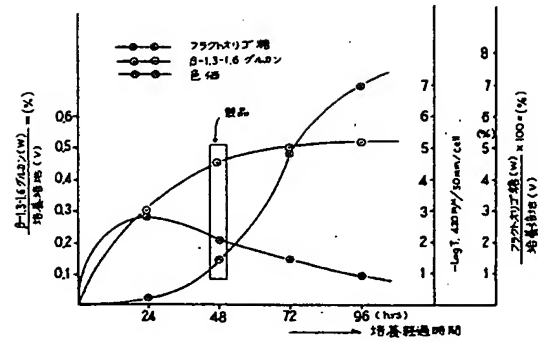


特開昭61-146192 (8)

第 3 図



第 4 図



第 5 図

